



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Cuantificación del nivel de polifenoles en chips

Autor/es

MARÍA MARTÍNEZ SÁEZ

Director/es

MARÍA PURIFIC. FERNÁNDEZ ZURBANO y MARÍA PILAR SÁENZ NAVAJAS ,

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Química

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2016-17



***Cuantificación del nivel de polifenoles en chips***, de MARÍA MARTÍNEZ SÁEZ (publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

# **CUANTIFICACIÓN DEL NIVEL DE POLIFENOLES EN CHIPS**



**María Martínez Sáez**

**TUTORAS**

**M<sup>a</sup> Purificación Fernández Zurbano**

**M<sup>a</sup> Pilar Sáenz Navajas**

**Facultad de Ciencia y Tecnología.**

**Departamento de Química (Área de Química Analítica)**

**Curso Académico:2016- 2017**



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
1.1. DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA QUÍMICA	9
1.2. PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS Y QUÍMICAS	10
1.3. VARIEDAD DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA MADERA DE ROBLE	11
1.4. CONTENIDO DE POLIFENOLES EN LA MADERA	12
1.5. BARRICAS Y OTRAS ALTERNATIVAS	12
1.6. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN Y EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES:	13
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN</b>	<b>19</b>
3.1. MATERIALES	21
3.2. INSTRUMENTACIÓN	23
3.2.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA SEMIPREPARATIVA	23
3.2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE UTRA ALTA RESOLUCIÓN (UHPLC)	24
3.2.3. OTROS EQUIPOS	24
<b>4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>25</b>
4.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE POLIFENOLES	27
4.2. PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO	27
4.3. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES	28
4.3.1. PREPARACIÓN RECTAS DE CALIBRADO	28
4.3.2. USO Y CONDICIONES EMPLEADAS EN UPLC-UV-VIS/MS	30
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
5.1. IDENTIFICACIÓN	33
5.2. CUANTIFICACIÓN	40
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>55</b>



## **RESUMEN**

Los polifenoles de la madera afectan directamente a propiedades organolépticas de los vinos, como el amargor y la astringencia. En este trabajo el objetivo principal es la identificación y cuantificación de polifenoles en chips de roble tostados y no tostados. Es importante conocer los distintos aspectos que afectan a la concentración de los polifenoles en los chips, como el lugar de origen de la madera, su nivel de tostado o la especie a la que pertenecen. Para llevar a cabo este trabajo se realiza una purificación del extracto, empleando una columna de permeación en gel (GPC) y se consiguen dos fracciones, F1 y F2 y empleando un detector de UV-Vis se comprueba en cuál de las dos fracciones son extraídos los compuestos. La identificación y cuantificación de los compuestos polifenólicos de las fracciones se realiza empleando cromatografía líquida de alta resolución para su separación (UPLC) acoplada a detectores de masas (MS) y ultravioleta-visible (UV-vis).

## **ABSTRACT**

Polyphenols impact directly on to the organoleptic features of red wine, such as bitterness and astringency. This project aims to determine and quantify the polyphenols present in toasted and non-toasted oak chips. It is necessary to know the various aspects that influence the polyphenols concentration in the chips, such as the origin of wood, toast levels or the wood species they are made of. In order to carry out this work, an extraction of polyphenols followed by a purification of this extract by gel permeation chromatography(GPC) is performed obtaining two fractions F1 and F2. Afterwards, an analysis over these fractions is carried out by using UV-Vis detector to determine in which fraction polyphenols are present. Finally, polyphenols identification and quantification is performed by combining MS and UV-Vis detectors coupled to a liquid chromatography of ultrahigh performance (UPLC)





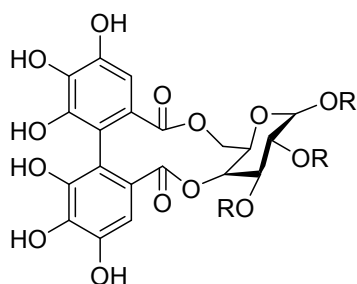
# 1. INTRODUCCIÓN



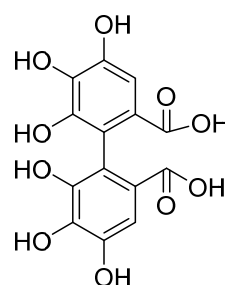
## 1.1. DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA QUÍMICA

Los taninos hidrolizables que comprenden a los galotaninos y a los elagitaninos son un tipo de polifenoles que se encuentran de manera natural en una gran variedad de frutas, frutos secos, y maderas. En la madera de roble los elagitaninos son los taninos mayoritarios.

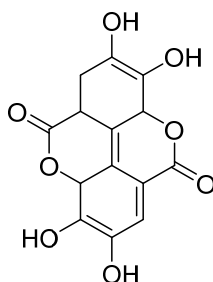
Estos compuestos poseen en su estructura (figura 1) una molécula de glucosa y un grupo conocido como HHDP (ácido hexahidroxidifénico) (figura 2),<sup>1</sup> el cuál en presencia de ácidos o bases fuertes se hidroliza liberando el ácido HHDP de los elagitaninos que sufre un reacción de lactonización espontánea dando origen al ácido elágico.<sup>1</sup> (figura 3)



**Figura 1:** Estructura elagitaninos.



**Figura2:** Ácido Hexahidroxidifénico



**Figura 3:** Ácido Elágico

## 1.2. PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS Y QUÍMICAS

Los polifenoles están presentes en la madera, y pueden ser extraídos por el vino ya que son solubles en disoluciones hidroalcohólicas.

Estos compuestos pueden modificar algunas propiedades organolépticas de los vinos, como la astringencia y el amargor, propiedades que se ven fundamentalmente afectadas por la presencia de elagitaninos.<sup>2</sup>

Por una lado la astringencia es uno de los términos más difíciles para definir, ha sido definida como una sensación táctil<sup>3</sup> y es descrita como una sensación oral de sequedad y de desbaste, debida a la formación de complejos formados por la unión de los taninos con las proteínas de la saliva dando lugar en ocasiones a la precipitación de las mucoproteínas salivales,<sup>4</sup> y da como resultado una saliva con propiedades lubricantes pobres.

Por otro lado, el amargor se define como uno de los cuatro sabores primarios y se detecta en las papilas de la parte posterior de la lengua.

Los elagitaninos tienen una alta capacidad antioxidante<sup>5,6</sup>, que puede deberse a su estructura, ya que poseen varios grupos hidroxilo capaces de ceder átomos de hidrógeno a radicales libres y tienen la capacidad de estabilizar y deslocalizar electrones desapareados. Además, en un medio ácido como es el vino, estos taninos se hidrolizan liberando ácido elágico.

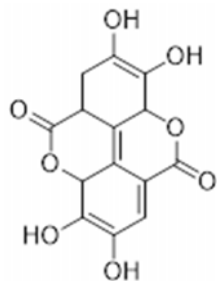
Los compuestos polifenólicos también se ven implicados en la estabilidad del color de los vinos.<sup>6</sup>

### 1.3. VARIEDAD DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA MADERA DE ROBLE

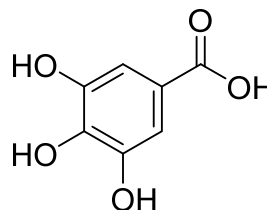
En la madera de roble aparecen compuestos como celulosa, hemicelulosa, lignina y compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos más frecuentes en la madera de roble y sus estructuras son:

- Ácidos fenólicos: Ácido gálico y ácido elágico. (Figuras 4 y 5)

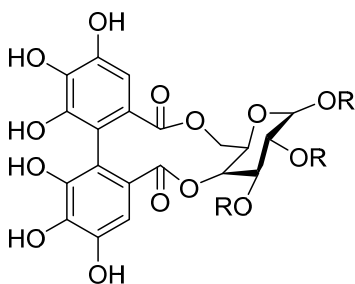


**Figura 4:** Estructura ácido elágico



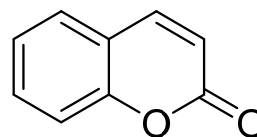
**Figura 5:** Estructura ácido gálico

- Elagitaninos. (Figura 6)



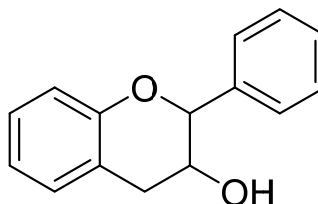
**Figura6:** Estructura elagitaninos.

- Cumarinas. (Figura 7)



**Figura 7:** Estructura cumarinas

- Flavanoles (Figura 8)



**Figura 8:** Estructura flavanoles

## 1.4. CONTENIDO DE POLIFENOLES EN LA MADERA

La cantidad de polifenoles en la madera, sobre todo la cantidad de elagitaninos, puede verse afectada por varios aspectos, como la especie de la madera, su origen geográfico y el tratamiento que la madera ha recibido<sup>7</sup>.

Según el origen de la madera se ha comprobado que normalmente es la madera de roble francés (*Q.petraea* y *Q.robur*) la que contiene una cantidad de elagitaninos mayor que la del roble americano (*Q.alba*), y además dentro del roble francés también hay diferencias respecto al contenido de estos compuestos, siendo más rico en elagitaninos *Q.robur* que *Q.petraea*.<sup>1</sup>

Otro factor importante es el nivel de tostado de la madera,<sup>9</sup> ya que estos compuestos sufren una degradación termolítica<sup>10,11</sup> durante el proceso de tostado, que provoca que el contenido en elagitaninos de maderas que han sido sometidas a procesos de tostado más intensos sea menor que las que no han sido sometidas a un proceso de tostado o han recibido un tostado ligero.

## 1.5. BARRICAS Y OTRAS ALTERNATIVAS

La crianza del vino en barricas es una técnica muy habitual<sup>7</sup>, consiste en mantener el vino en contacto con la madera de la barrica, generalmente de roble. Esto permite mejorar ciertas propiedades de los vinos gracias a la pequeña entrada de oxígeno a través de los poros de la madera<sup>8</sup>, y a la extracción de algunos compuestos. Un ejemplo de esto es la extracción de los elagitaninos<sup>8</sup>, cuyo interés ha dado lugar a varios estudios sobre la cuantificación de estos compuestos, pero hasta ahora solo se han estudiado en maderas sin tostar.

Hoy en día están apareciendo otras alternativas<sup>9</sup> a las barricas, como por ejemplo poner en contacto los vinos con chips, duelas, virutas, etc, de madera de roble, que también permiten la extracción de compuestos y aromas en el vino. El objetivo de esta técnica es mejorar las propiedades sensoriales de los vinos. Esta nueva técnica suele usarse durante el envejecimiento, aunque también uno de los usos a los que se destinan este tipo de productos de manera alternativa es durante la fermentación alcohólica de vinos blancos y tintos, con la finalidad de extraer compuestos del aroma y también compuestos no volátiles, principalmente elagitaninos, que varían el amargor y astringencia de los vinos<sup>2</sup>.

## **1.6. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN Y EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES:**

Para la determinación y extracción de polifenoles se han realizado varios trabajos, en los cuales los disolventes más empleados para la extracción de estos compuestos de los fragmentos de madera son mezclas de acetona y agua<sup>10</sup>, debido a que estos compuestos son polares y son compuestos hidrosolubles<sup>11</sup>.

Para el análisis de estos compuestos se realiza un fraccionamiento previo para obtener fracciones ricas en estos compuestos, y así purificar los extractos.<sup>12</sup>

Uno de los métodos más empleados para la cuantificación de polifenoles es el empleo de HPLC(cromatografía líquida de alta resolución), que permite la separación de estos compuestos<sup>13,14</sup>. Normalmente se usa esta técnica equipada con un detector de ultravioleta-visible adquiriendo a longitudes de onda de 250 nm, ya que en esta longitudes se encuentran los máximos de absorción de estos compuestos, también puede emplearse otros detectores, como un detector de masas, que aumenta la sensibilidad de la cuantificación respecto al detector UV-Vis. Estos detectores permiten la cuantificación de polifenoles.





## 2. OBJETIVOS



Este trabajo tiene dos objetivos principales, por un lado, una etapa de puesta a punto de un método de análisis, en este caso análisis de compuestos polifenólicos en extractos de chips y por otro lado identificación y cuantificación de compuestos polifenólicos en extractos de chips (tostados y sin tostar) procedentes de diferentes chips comerciales.

Para conseguir ambos objetivos es necesario realizar las siguientes tareas:

1. Obtención del extracto crudo de polifenoles.
2. Purificación del extracto.
3. Identificación de polifenoles.
4. Cuantificación de polifenoles.

A diferencia de otros trabajos anteriores se evaluará el efecto del tostado (tostado y sin tostar) y el tipo de roble (americano y francés) en la concentración de polifenoles. Siendo nuestra hipótesis, que el contenido de los mismos disminuirá con el tostado debido a que son compuestos termodegradables.



### **3. MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN**



### 3.1. MATERIALES

Los chips de madera proporcionados por Tonelería Mecánica Riojana y empleados en este trabajo fueron:

- **Rizo Americano (sin tostar).**
- **Rizo Francés (sin tostar).**
- **Chip Francés (tostado medio).**
- **Chip Americano (tostado medio).**

Los patrones empleados para el análisis químico fueron:

Suministrados por Sigma Aldrich:

- **Ácido Gálico monohidratado  $\geq 99\%$ :**  
PM:188.13  
Nº CAS: 5995-86-8
- **Ácido Elágico:**  
PM:302.19  
Nº CAS:476-66-4

Suministrados por Phytolab:

- **Vescalagina:**  
PM:934.63  
Nº CAS: 36001-47-5
- **Castalagina:**  
PM:934.63  
Nº CAS: 24312-00-3

Los disolventes empleados fueron:

Suministrados por Scharlab:

- **Ácido fórmico 98-100%:**  
Nº CAS: 64-18-6  
Densidad:1.22 g/cm<sup>3</sup>
- **Acetona:**  
Nº CAS:67-64-1  
Densidad: 0.79 g/cm<sup>3</sup>
- **Acetonitrilo:**  
Nº CAS: 75-05-8  
Densidad:0.781 g/cm<sup>3</sup>
- **Ácido fórmico para LC-MS:**  
Nº CAS:64-18-6  
Densidad: 1.22 g/cm<sup>3</sup>

Suministrados por VWR PROLABO CHEMICALS:

- **Etanol absoluto:**  
Nº CAS :64-17-5  
Densidad:0.79 g/cm<sup>3</sup>

OTROS:

- **Gel de fraccionamiento:**  
TOYOPEARL HW-50F



## 3.2. INSTRUMENTACIÓN

### 3.2.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA SEMIPREPARATIVA

El fraccionamiento de los extractos de madera se realizó empleando un cromatógrafo de líquidos semipreparativo. El cromatógrafo estaba integrado por un inyector de GILSON GX-271, y una bomba HPLC 322, conectado a una columna GPC de 12×120mm rellena con un Gel Toyopearl HW-50 y finalmente un detector UV-Vis GILSON. El control de este instrumento se realizó usando el software TRILUTION LC.

El uso del cromatógrafo de líquidos semipreparativo se empleó con la finalidad de obtener una mayor purificación de los compuestos que se van a estudiar y determinar en cuál de las fracciones son eluidos estos compuestos.



**Figura 9.** Cromatógrafo líquido semipreparativo.

### 3.2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE UTRA ALTA RESOLUCIÓN (UHPLC)

La cuantificación y caracterización de los compuestos se realizó con UPLC (cromatografía líquida de ultra resolución) Shimadzu Nexera con un detector UV-Vis Shimadzu SPD-M20A y acoplado a un espectrómetro de masas AB Sciex 3200QTRAP, con triple cuadrupolo y fuente de ionización por electrospray en modo positivo y negativo.

El control de este instrumento se realizó usando el software Analyst<sup>®</sup> 1.6.2.



**Figura 10:** UPLC-UV-Vis/MS

### 3.2.3. OTROS EQUIPOS

- Liofilizador Telstar LyoQuest.
- Rotavapor, modelo HEI-VAP(Heidolph).
- Agitador, modelo Vibramax-100(Heidolph)
- Balanza analítica: Mettler Toledo.



**Figura 11:** Liofilizador.

## **4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**



## 4.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE POLIFENOLES

En primer lugar, se extrajeron los polifenoles contenidos en 500 mg de chips con 10 ml de una disolución acetona/agua (70:30) dejándolos en agitación a temperatura ambiente 180 min. El extracto obtenido se filtró, se evaporó empleando el rota-vapor con la finalidad de eliminar la acetona, y se liofilizó para eliminar el agua y compuestos volátiles. La extracción se realizó por triplicado para cada una de las muestras.

Las cantidades pesadas de cada uno de ellos se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Cantidad pesada de cada uno de los chips (mg)

MUESTRA	PESO C. FRANCÉS (mg)	PESO R. FRANCÉS (mg)	PESO R. AMERICANO (mg)	PESO G. AMERICANO (mg)
1	565.2	532.0	538.1	528.7
2	523.7	513.4	530.9	538.0
3	548.5	521.8	528.1	501.2

## 4.2. PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO

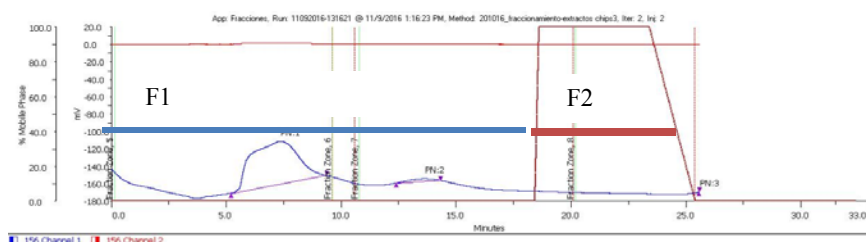
El extracto crudo liofilizado se disolvió en 12 ml de agua destilada, y se empleó la cromatografía líquida semipreparativa para purificarlos, inyectando 2 ml de los extractos en una columna GPC, y finalmente se obtuvieron dos fracciones:

- F1, que se eluyó con 2 mL de agua: etanol: ácido fórmico 44:55:1 durante 19 minutos.
- F2, que se eluyó con 2 mL de acetona: agua 40:60 durante 5 minutos.

Ambas fracciones se evaporaron y se liofilizaron.

Esta etapa de purificación se realizó por duplicado para cada una de las muestras.

Además, como el cromatógrafo de líquidos semipreparativo estaba acoplado a un detector UV-Vis, se midió a una longitud de onda de 250 nm, ya que esta es la longitud de onda a la que absorben estos compuestos. Se comprobó la presencia de polifenoles como se muestra en la figura 12 con la línea azul, además se observa que en la fracción de la zona b (F2) la absorbancia fue menor, lo que nos indica que la mayor parte de los polifenoles se encuentran en la zona a (F1).



**Figura 12:** Espectro UV-Vis chip francés. (Línea azul a 250 nm)

Finalmente, ambas fracciones se evaporaron y se liofilizaron, y los extractos liofilizados se disolvieron en 2 ml de agua para ser inyectados posteriormente en el sistema UPLC-UV-Vis/MS.

### 4.3. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES

#### 4.3.1. PREPARACIÓN RECTAS DE CALIBRADO

Para la cuantificación de los polifenoles en las muestras es necesaria la preparación de rectas de calibrado, para su preparación se usaron 4 patrones con un intervalo de concentración de 0-75 ppm. Los patrones empleados fueron ácido gálico, ácido elágico, castalagina y vescalagina.

##### RECTA DE CALIBRADO DE ÁCIDO GÁLICO

Se pesaron 104,6 mg de ácido gálico y se disolvieron en 5 ml de etanol puro. A partir de esta disolución madre se preparó otra 10 veces más diluida que permitió la preparación de disoluciones menos concentradas tal y como se muestra en la tabla 2. Estas diluciones fueron diluidas en agua:fórmico (99.9:0.1) por ser el eluyente polar empleado en la cromatografía.

**Tabla 2.** Disoluciones patrón preparadas para la calibración del ácido gálico.

Disolución	V (μl) D.concentrada	V (μl) D. 52.30 ppm	V (μl) D. 10.46 ppm	V(ml) final	Concentración final(ppm)
1	180.0	-	-	5.00	75.31
2	125.0	-	-	5.00	52.30
3	50.0	-	-	5.00	20.92
4	25.0	-	-	5.00	10.46
5	-	500.0	-	5.00	5.23
6	-	500.0	-	5.00	0.52
7	-	-	50.0	5.00	0.11
8	-	-	-	5.00	0.00

##### RECTA DE CALIBRADO DE ÁCIDO ELÁGICO

Se pesaron 13.00 mg de ácido elágico que se disolvieron en 2 ml de NaOH 1 N. A partir de esta disolución madre se preparó otra 10 veces diluida para la preparación de diluciones menos concentradas como se muestra en la tabla 3. Las disoluciones fueron diluidas en agua: fórmico (99.9:0.1)

**Tabla 3.** Disoluciones patrón preparadas para la calibración del ácido elágico.

Disolución	V (μl) D.concentrada	V (μl) D. 52.30 ppm	V (μl) D. 10.46 ppm	V(ml) final	Concentración final(ppm)
1	58.0	-	-	5.00	75.40
2	38.0	-	-	5.00	49.40
3	15.0	-	-	5.00	19.50
4	-	1000	-	5.00	9.88
5	-	500.0	-	5.00	4.94
6	-	50.0	-	5.00	0.49
7	-	10.0	-	5.00	0.10
8	-	-	-	5.00	0.00

#### RECTA DE CALIBRADO CASTALAGINA

Para la preparación de esta recta se disolvieron 5.70 mg de castalagina en 5 ml de etanol, y luego se realizaron las disoluciones que se muestran en la tabla 4:

**Tabla 4.** Disoluciones patrón preparadas para la calibración del castalagina

Disolución	V (μl) D.concentrada	V (μl) D. 52.30 ppm	V (μl) D. 10.46 ppm	V(ml) final	Concentración final(ppm)
1	33.0	-	-	5.00	75.24
2	25.0	-	-	5.00	57.00
3	10.0	-	-	5.00	22.80
4	-	1000	-	5.00	11.40
5	-	500.0	-	5.00	5.70
6	-	500.0	-	5.00	0.57
7	-	-	25.0	5.00	0.11
8	-	-	-	5.00	0.00

#### RECTA DE CALIBRADO VESCALAGINA:

Para la preparación de esta recta se disolvieron 5.05 mg de vescalagina en 5 ml de etanol, y luego se realizaron las disoluciones que aparecen en la tabla 5:

**Tabla 5.** Disoluciones patrón preparadas para la calibración del vescalagina

Disolución	V (μL) D.concentrada	V (μL) D. 52.30 ppm	V (μL) D. 10.46 ppm	V(ml) final	Concentración final(ppm)
1	37.0	-	-	5.00	74.74
2	25.00	-	-	5.00	50.50
3	100.0	-	-	5.00	20.20
4	-	1000	-	5.00	10.10
5	-	500.0	-	5.00	5.05
6	-	50.0	-	5.00	0.51
7	-	-	25.0	5.00	0.10
8	-	-	-	5.00	0.00

#### 4.3.2. USO Y CONDICIONES EMPLEADAS EN UPLC-UV-VIS/MS

Tanto las muestras como los patrones se introdujeron en viales de 2 ml y se inyectaron en UPLC con las siguientes condiciones:

- Columna: AcQuity BEH C18 (1.7 μm × 2.1 mm × 100 mm)
- Fase A: agua: fórmico (99.9:0.1)
- Fase B: acetonitrilo: fórmico (99.9:0.1)
- T° Columna: 40°C
- Volumen de inyección: 7.5 μL
- Flujo: 0.45 ml/ min
- Longitud de onda UV-Vis: 250 nm
- Método Full Scan en masas.
- Ionización negativa.

El gradiente utilizado se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6.** Gradientes de elución empleados en el UHPLC.

Tiempo(min)	0	4	11	13.5	14.5	15	16.5
A%	99	92	70	0	0	99	99
B%	1	8	30	100	100	1	1



## **5. RESULTADOS**

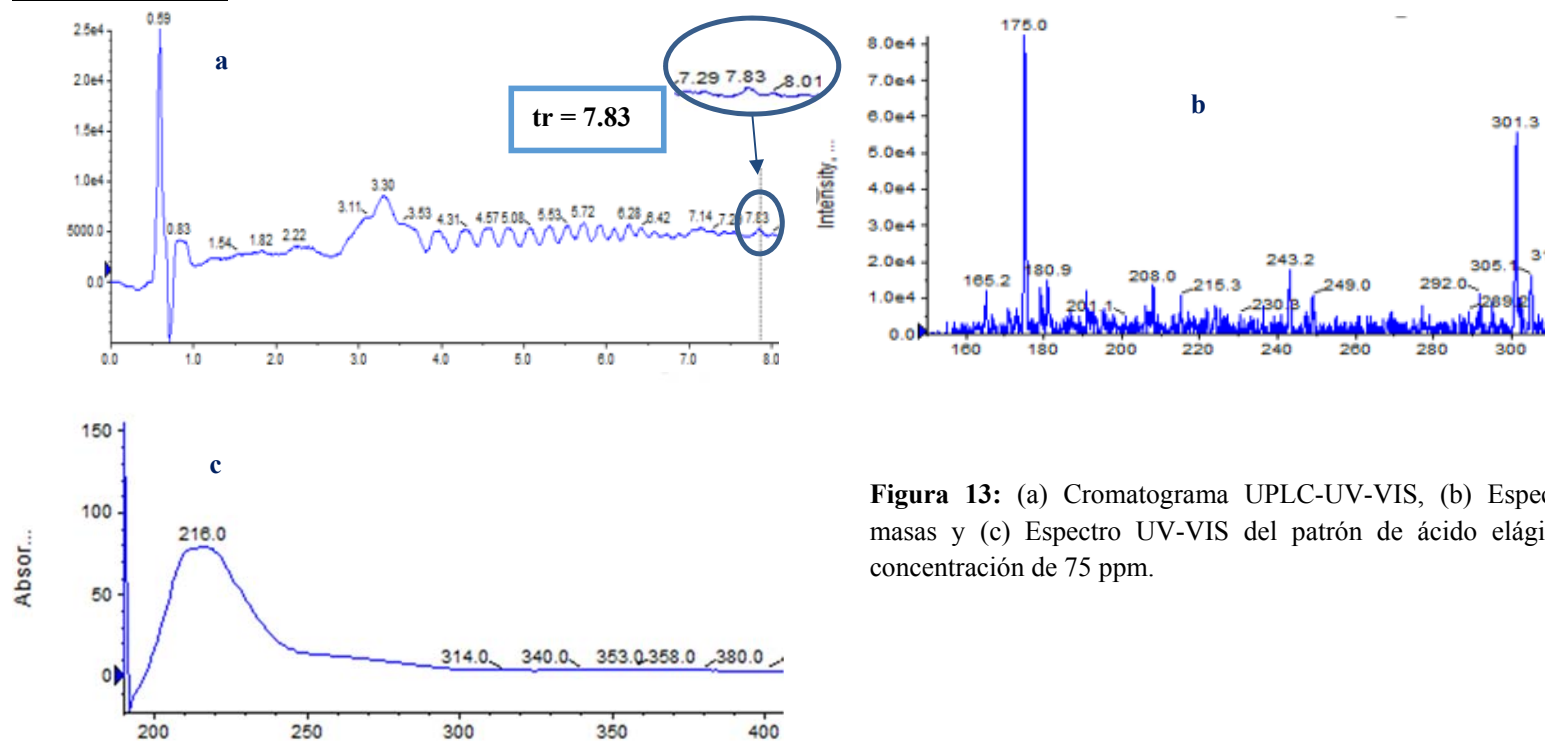


## 5.1. IDENTIFICACIÓN

### PATRONES

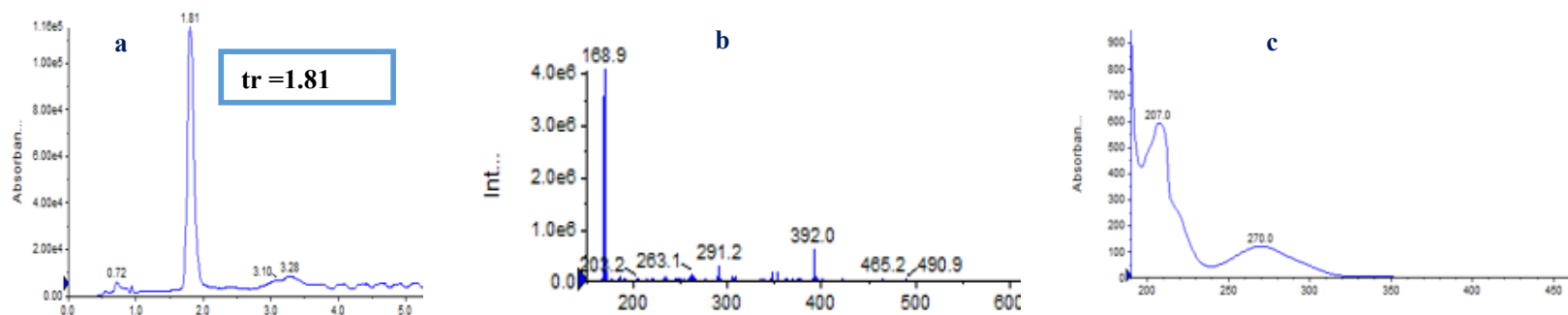
Para la identificación de los polifenoles en nuestras muestras se emplearon patrones de ácido gálico, ácido elágico, castalagina y vescalagina. Estas diferentes disoluciones fueron inyectadas en el UPLC-UV-Vis/MS, lo que permitió obtener los tiempos de retención de cada uno de los compuestos, tal y como puede verse en las figuras 13 a la 16.

### ÁCIDO ELÁGICO



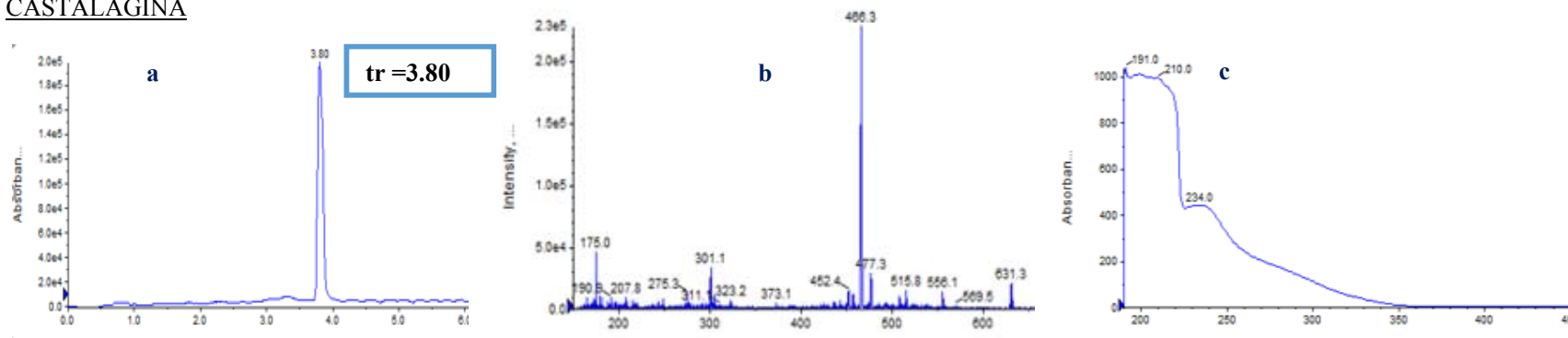
**Figura 13:** (a) Cromatograma UPLC-UV-VIS, (b) Espectro de masas y (c) Espectro UV-VIS del patrón de ácido elágico con concentración de 75 ppm.

### ÁCIDO GÁLICO

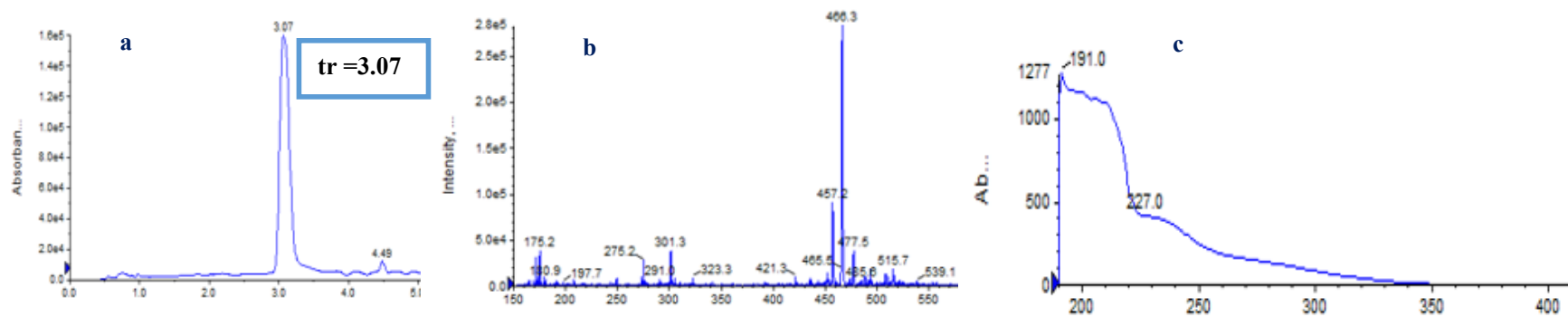


**Figura 14:** (a) Cromatograma UPLC-UV-VIS, (b) Espectro de masas y (c) Espectro UV-VIS del patrón de ácido gálico con concentración de 75 ppm.

### CASTALAGINA



**Figura 15:** (a) Cromatograma UPLC-UV-VIS (b) Espectro de masas (c) y Espectro UV-VIS del patrón de castalagina con concentración de 75 ppm.

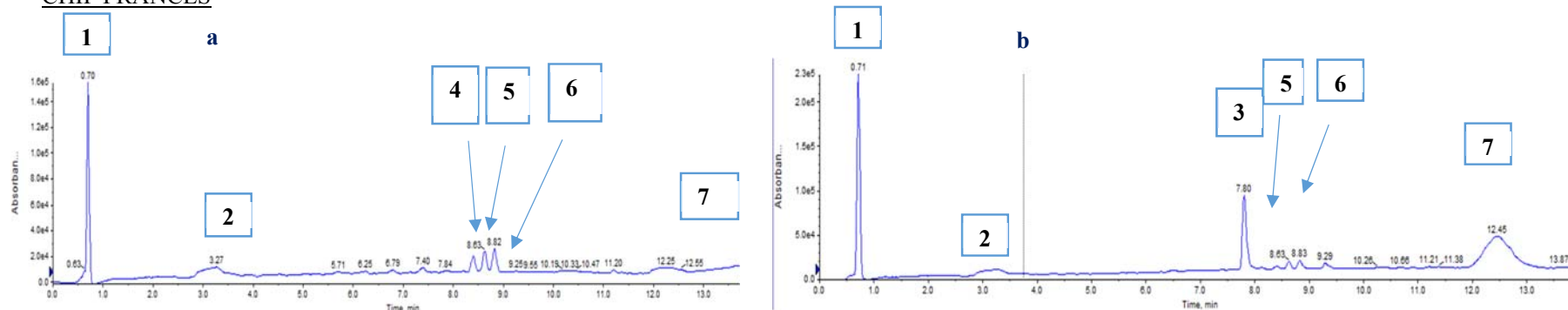
VESCALAGINA

**Figura 16:**(a) Cromatograma UPLC-UV-VIS, (b) Espectro masas y (c) Espectro UV-VIS del patrón de vescalagina con concentración de 75 ppm.

### MUESTRAS:

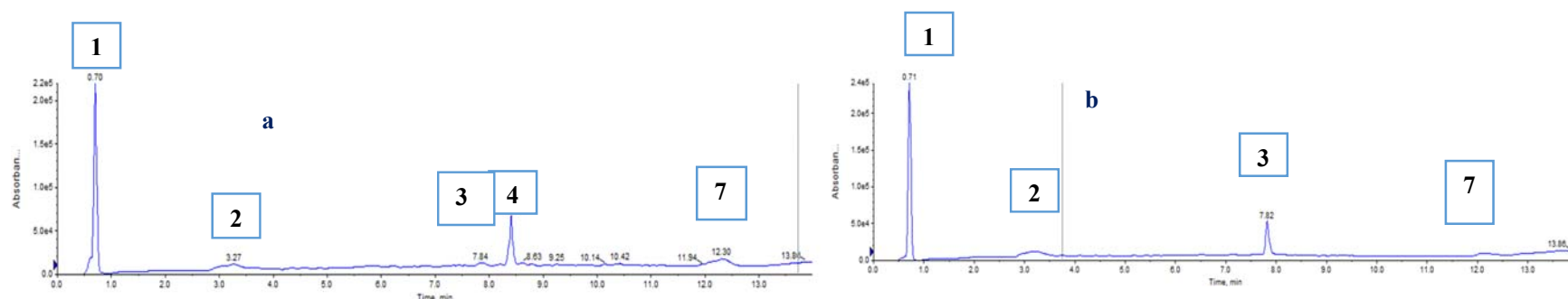
Las diferentes muestras obtenidas de los extractos de madera se inyectaron bajo las mismas condiciones que las empleadas para las disoluciones patrón, con el fin de poder identificar los compuestos que aparecían en cada una de ellas. Cada una de las muestras se pinchó dos veces y la mayoría de los picos que se obtuvieron correspondieron a compuestos diferentes a los patrones empleados, como muestran las figuras 17-20 en el caso de los picos 1,2,4,5,6 y 7.

#### CHIP FRANCÉS



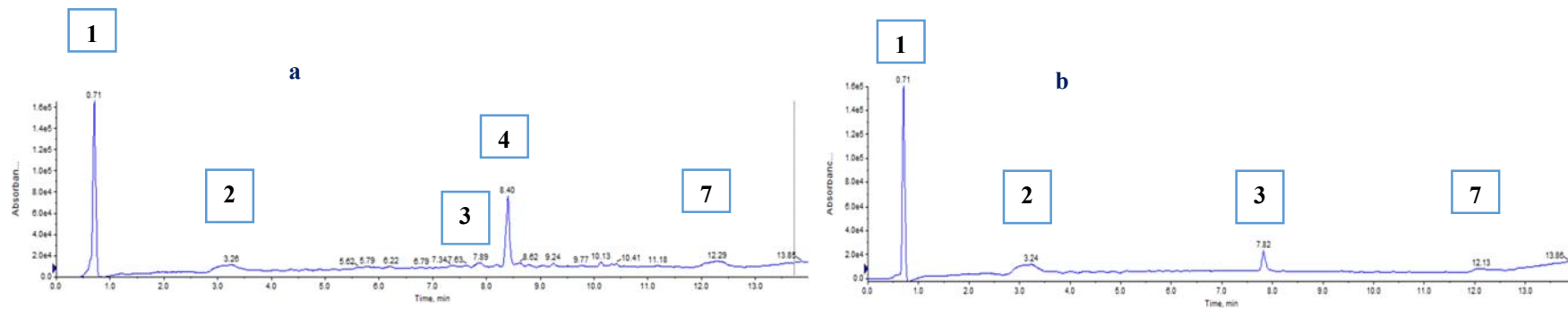
**Figura 17:** Cromatograma UPLC-UV-Vis(250nm) (a) fracción 1 y (b) fracción 2 de la muestra de Chip Francés.

#### RIZO FRANCÉS



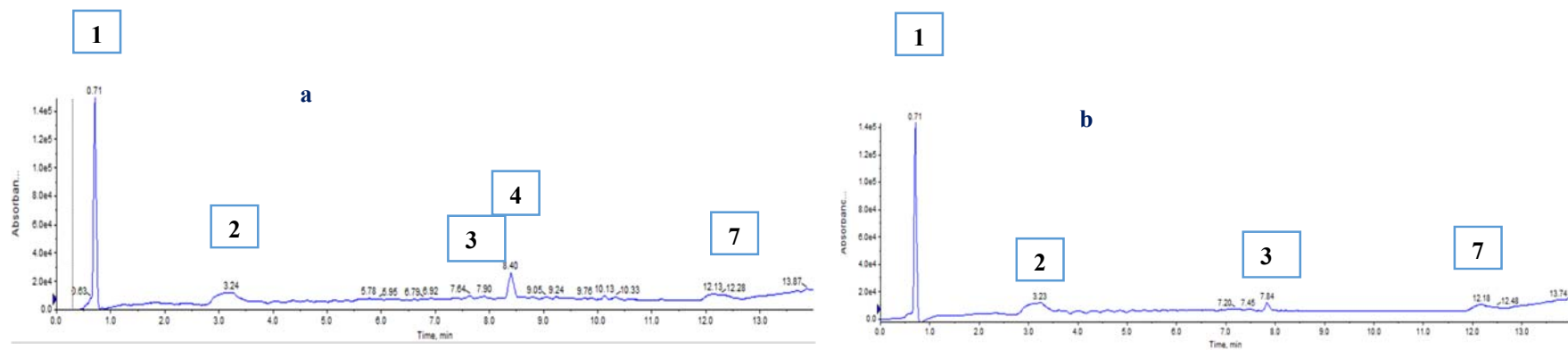
**Figura 18:** Cromatograma UPLC-UV-Vis(250nm) (a) fracción 1 y (b) fracción 2 de la muestra de Rizo Francés.

### RIZO AMERICANO



**Figura 19:** Cromatograma UPLC-UV-Vis(250nm) (a) fracción 1 y (b) fracción 2 de la muestra Rizo Americano.

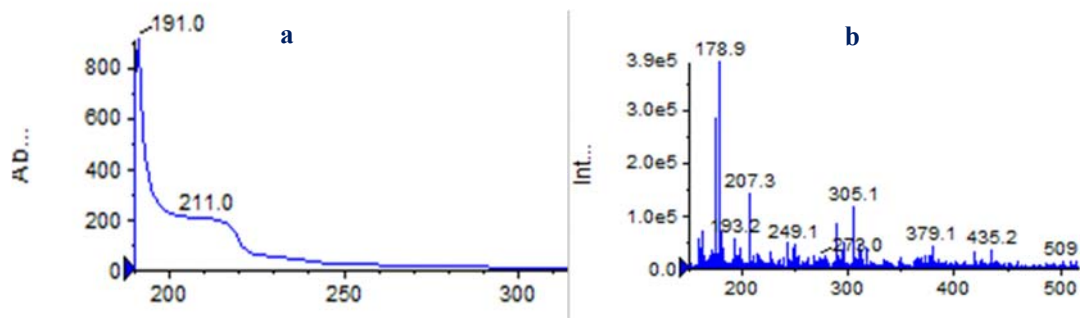
### GRANULADO AMERICANO



**Figura 20:** Cromatograma UPLC-UV-Vis(250nm) (a) fracción 1 y (b) fracción 2 de la muestra de chip Americano.

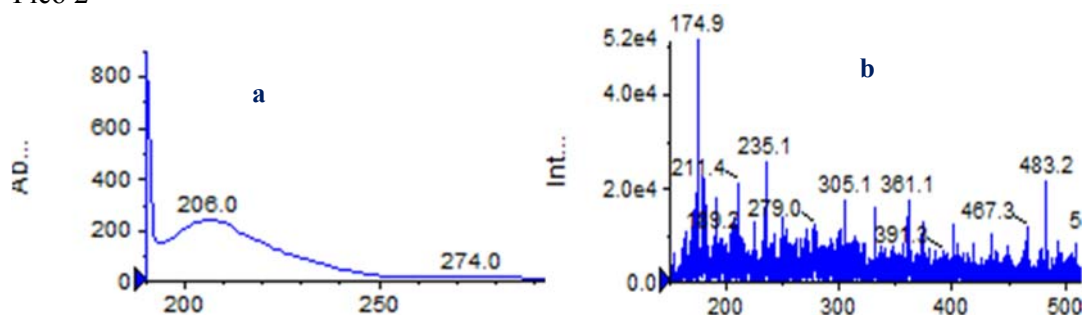
De cada uno de los picos se estudió su espectro UV-VIS y MS. (Figura 21-27)

Pico 1



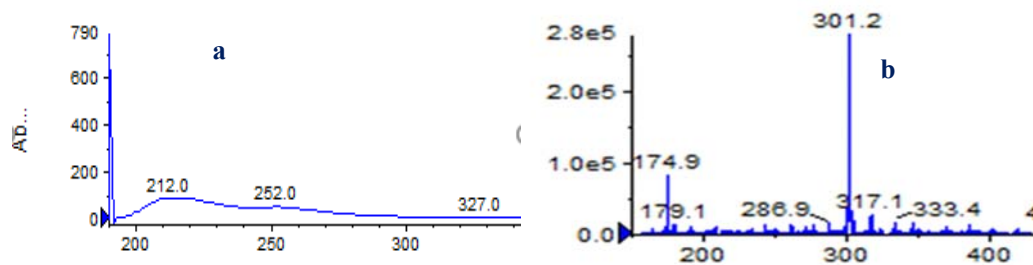
**Figura 21:** Espectro(a) UV-Vis y (b) masas del pico 1.

Pico 2



**Figura 22:** Espectro (a) UV-Vis y (b) masas del pico 2.

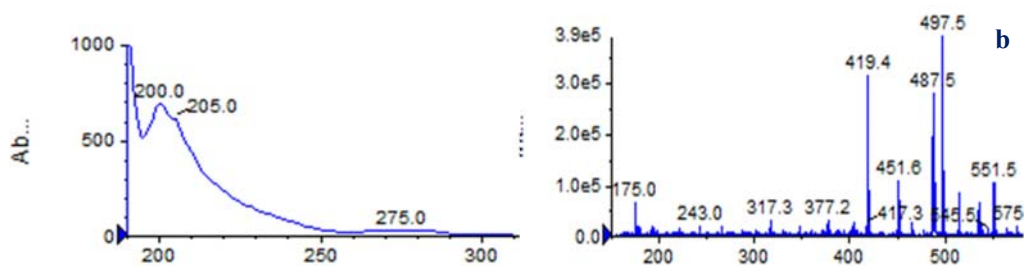
Pico 3



**Figura 23:** Espectro (a) UV-Vis y (b) masas del pico 3.

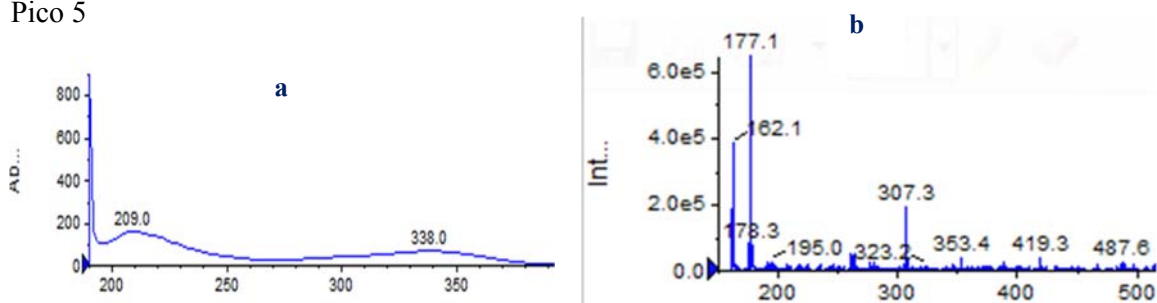


## Pico 4



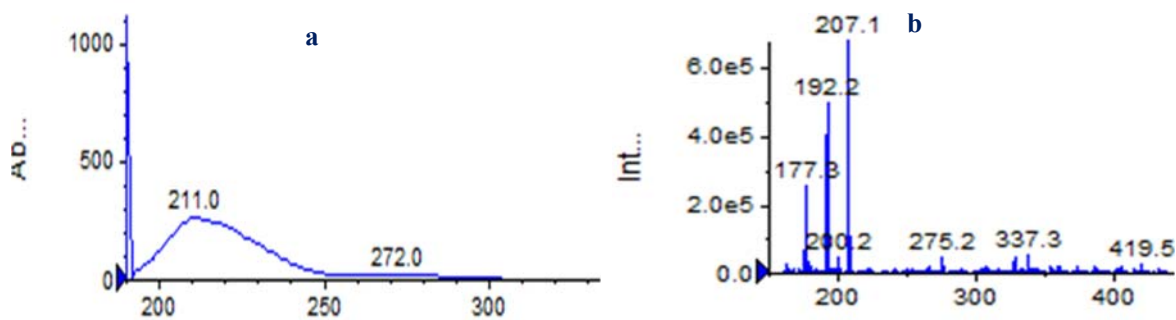
**Figura 24:** Espectro(a) UV-Vis y (b) masas del pico 4.

## Pico 5



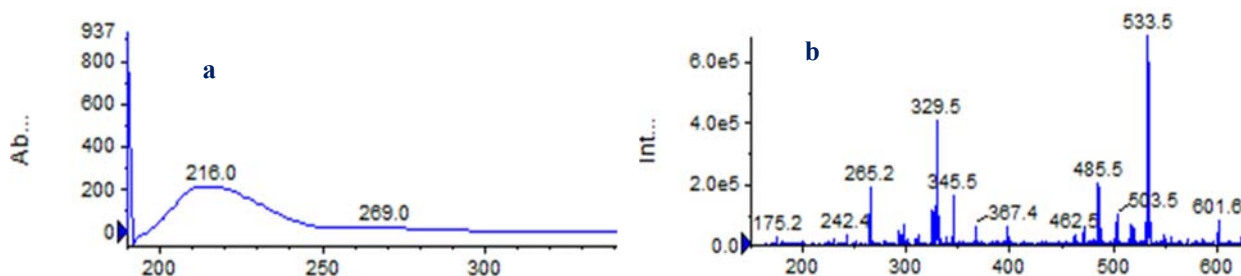
**Figura 25:** Espectro (a) UV-Vis y (b) masas del pico 5.

## Pico 6



**Figura 26:** Espectro(a) UV-Vis y (b) masas del pico 6.

Pico 7



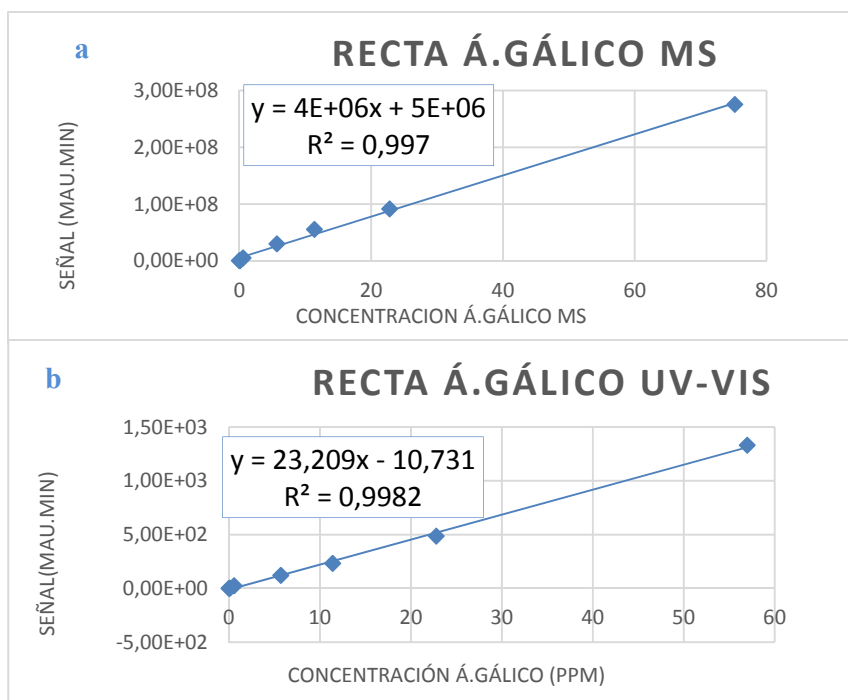
**Figura 27:** Espectro(a) UV-Vis y (b) masas del pico 7.

## 5.2. CUANTIFICACIÓN

### RECTAS DE CALIBRADO

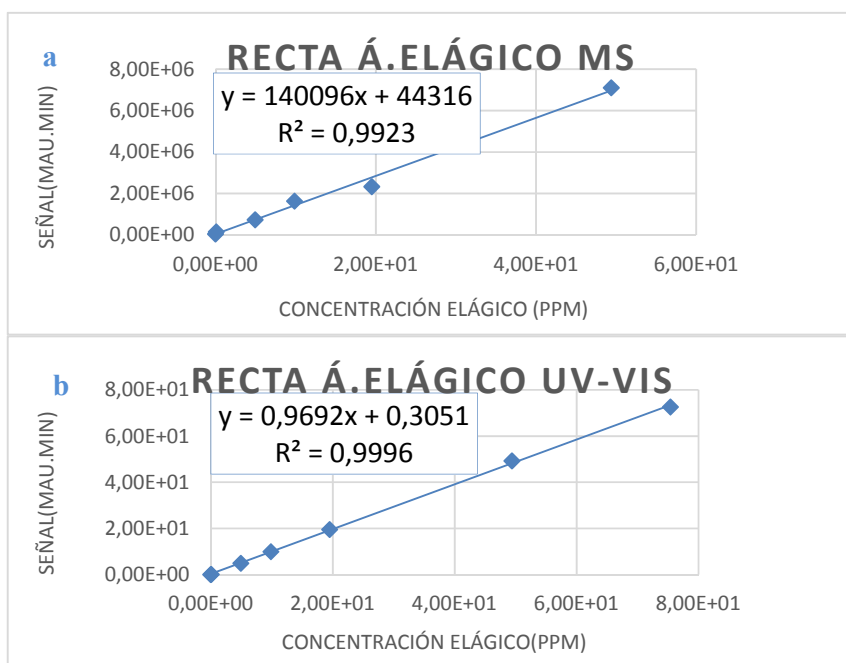
Se hicieron dos inyecciones de cada una de las disoluciones patrón preparadas. Esto permitió, previa integración de los picos, obtener las rectas de calibrado, tanto por detección mediante espectrometría de masas (MS) como por UV-Vis (250nm). En las figuras 28-31, se muestran las rectas de calibrado obtenidas.

### ÁCIDO GÁLICO



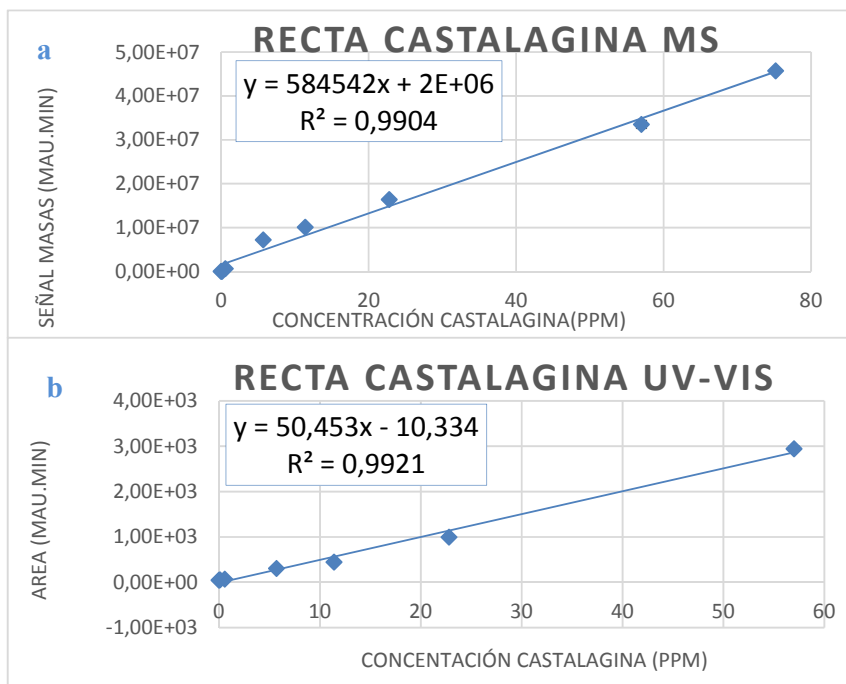
**Figura 28:** Rectas de calibrado mediante (a) MS y (b) UV-Vis del ácido gálico.

## ÁCIDO ELÁGICO

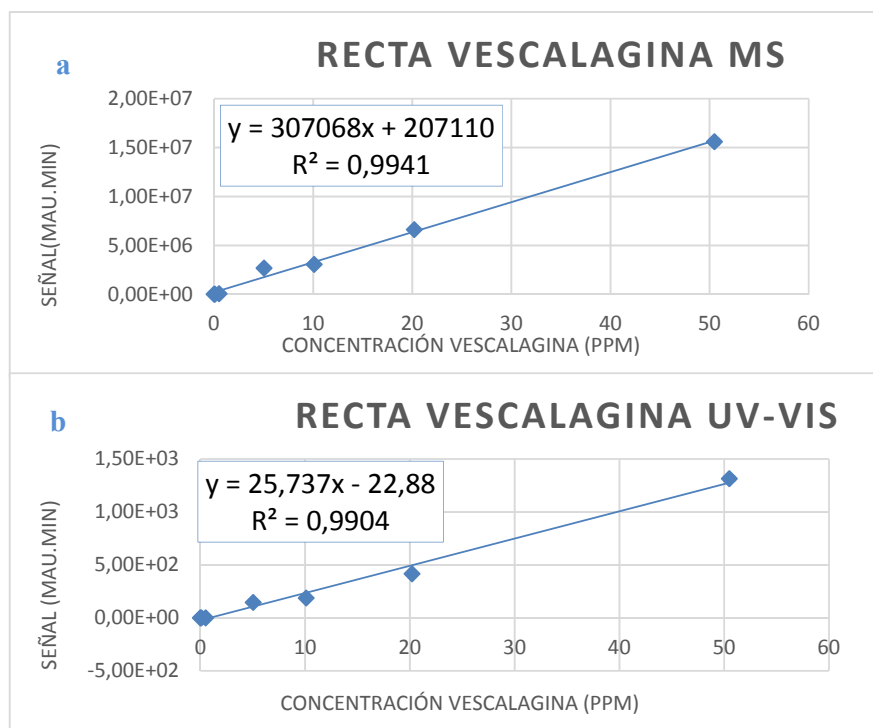


**Figura 29:** Rectas de calibrado mediante (a) MS y (b) UV-Vis de ácido elágico.

## CASTALAGINA



**Figura 30:** Rectas de calibrado mediante (a) MS y (b) UV-Vis de castalagina.

VESCALAGINA

**Figura 31:** Rectas de calibrado mediante (a) MS y (b) UV-Vis de vescalagina.

Con las rectas se comprobó que el intervalo de concentraciones empleadas está dentro del rango lineal. En todos los casos el  $R^2$  se encontró entre 0.9904 y 0.9996.

## MUESTRAS

Para la cuantificación de las muestras se realizaron diluciones de estas ya que en el caso del ácido elágico y los picos no identificados las áreas no entraban dentro del rango de cuantificación de nuestra recta de calibrado. Para ello se realizaron las diluciones que se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Diluciones realizadas en las muestras.

MUESTRA	V( $\mu$ L)	V final(ml)
C. FRANCÉS FRACCION 1	80.0	1.00
C. FRANCÉS FRACCION 2	60.0	1.00
R. FRANCÉS FRACCION 1	90.0	1.00
R. FRANCÉS FRACCION 2	30.0	1.00
R. AMERICANO FRACCION 1	70.0	1.00
R.AMERICANO FRACCION 2	60.0	1.00
C.AMERICANO FRACCION 1	100.0	1.00
C. AMERICANO FRACCION 2	100.0	1.00

Además, la concentración de los picos no identificados fue expresada en mg/L de ácido elágico, ya que se vio que la mayoría de ellos presentaban un patrón de fragmentación similar al del ácido elágico ( $m/z$ 175 y/o 301), lo que sugería que eran derivados de este.

### LIMITES DE DETECCION Y DE CUANTIFICACIÓN

Con el fin de calcular la sensibilidad de los detectores empleados en el análisis, se calcularon los LD y LQ como la concentración equivalente a 3 y 10 veces, respectivamente, la altura promedio del ruido de fondo en la zona de alrededor del pico. Este cálculo se llevó a cabo con ambos detectores.

El procedimiento seguido para el cálculo de los LD y LQ en muestras reales fue el siguiente:

Límite de detección (LD): menor cantidad de analito que genera una señal distinta de cero, y por tanto puede ser detectada.

$$LD = \frac{\text{CONCENTRACIÓN DEL COMPUESTO A}}{\text{ALTURA DEL PICO A}} \times 3 \times \text{ALTURA DEL RUIDO}$$

Límite de cuantificación (LQ): Menor cantidad de analito que puede ser cuantificada.

$$LQ = \frac{\text{CONCENTRACIÓN DEL COMPUESTO A}}{\text{ALTURA DEL PICO A}} \times 10 \times \text{ALTURA DEL RUIDO}$$

Para ello se realizan los siguientes pasos:

- 1) Calcular la concentración de los compuestos interpolando el área en las rectas.
- 2) Calcular la altura real para el pico del compuesto.
- 3) Hacer un zoom en la línea base de alrededor del pico del compuesto y medir la altura media del ruido (altura del ruido).

Los resultados que se obtuvieron aparecen en la tabla 8:

**Tabla 8.** Límites de detección y cuantificación de los compuestos estudiados.

	LD MS (ppm)	LQ MS(ppm)	LD UV-Vis (ppm)	LQ UV-Vis (ppm)
<b>Á.Elágico</b>	2.85 ±0.18	9.51 ±0.61	12.00±0.71	39.90±2.80
<b>Á.Gálico</b>	2.50×10 <sup>-2</sup> ±0.01	8.33×10 <sup>-2</sup> ±0.02	3.71±0.50	12.40±1.71
<b>NI 1*</b>				
<b>NI 4</b>	1.08 ±0.11	3.59±0.37	10.11±0.22	33.80±0.51
<b>NI 5</b>	5.76±0.66	19.20±2.21	14.60±0.70	48.80±2.20
<b>NI 6</b>	3.51±0.11	11.71±0.40	13.10±0.31	43.70±0.51

\*No se calculó el límite de cuantificación ni de detección para el pico NI1 ya que como se explica más adelante este pico se trata de una impureza presente en alguna de los disolventes que constituyen las fases A o B.

Los resultados mostraron que el detector de masas es más sensible que el de UV-Vis, desde 2 veces más sensible para el pico NI4, hasta más de 100 veces en el caso del ácido gálico, por lo que se usó el detector de masas para la cuantificación.

Finalmente, los resultados correspondientes a la concentración de cada uno de los compuestos en las distintas muestras se muestran en la tabla 9:

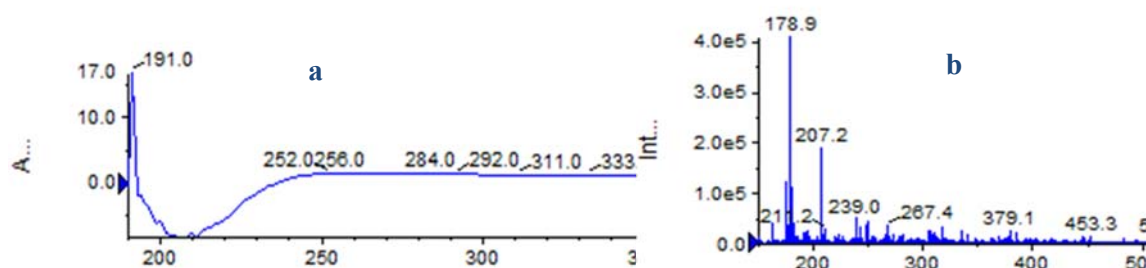
**Tabla 9:** Concentración de los compuestos encontrados ( $\mu\text{g/g}$  muestra) ND: no detectados. CF: chip francés. RF: rizo francés. RA: rizo americano. CA: chip americano.

	C.F. F1	C.F. F2	R.F. F1	R.F. F2	R.A. F1	R.A. F2	C.A. F1	C.A. F2
<b>Á. GÁLICO (<math>\mu\text{g/g}</math> muestra)</b>	*	ND	$3.68 \times 10^{-1} \pm 0.01$	ND	*	ND	ND	ND
<b>Á.ELÁGICO (<math>\mu\text{g/g}</math> muestra)</b>	$86.70 \pm 3.31$	$6.79 \times 10^2 \pm 1.01$	$1.64 \times 10^2 \pm 1.90$	$2.44 \times 10^3 \pm 4.17$	$1.31 \times 10^2 \pm 1.90$	$1.12 \times 10^3 \pm 2.58$	$49.50 \pm 0.51$	$2.65 \times 10^2 \pm 1.97$
<b>NI 1 (<math>\mu\text{g/g}</math> muestra)*</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>NI 4 (<math>\mu\text{g/g}</math> muestra)*</b>	$3.56 \times 10^2 \pm 0.46$	ND	$4.65 \times 10^2 \pm 1.85$	ND	$4.52 \times 10^2 \pm 0.94$	ND	$3.55 \times 10^2 \pm 1.14$	ND
<b>NI 5 (<math>\mu\text{g/g}</math> muestra)*</b>	$2.11 \times 10^2 \pm 3.24$	ND	*	ND	*	ND	*	ND
<b>NI6 (<math>\mu\text{g/g}</math> muestra)*</b>	$2.87 \times 10^2 \pm 1.36$	ND	*	ND	*	ND	*	ND

\* Fueron detectados, pero no pudieron ser cuantificados, ya que estaban por debajo del límite de cuantificación (LQ).



\*El pico NI1 finalmente no fue cuantificado, ya que al hacer las diluciones salían concentraciones similares a las obtenidas antes de diluir. Además, también aparece en los patrones, lo que en principio hizo pensar que puede tratarse de una contaminación en algunos de los disolventes de las fases. Por otro lado, puede que las concentraciones sean tan altas que el detector este saturado aun después de realizar diluciones. Para comprobar que podía pasar se pinchó una muestra en UPLC, la cual no contenía ni patrones ni muestra (un blanco), y se comprobó que seguía apareciendo el pico. Para ver si se trataba del mismo pico se estudiaron sus espectros de masas y de UV-Vis mostrados en la figura 32 y se compararon con los obtenidos en las muestras (figura 21).

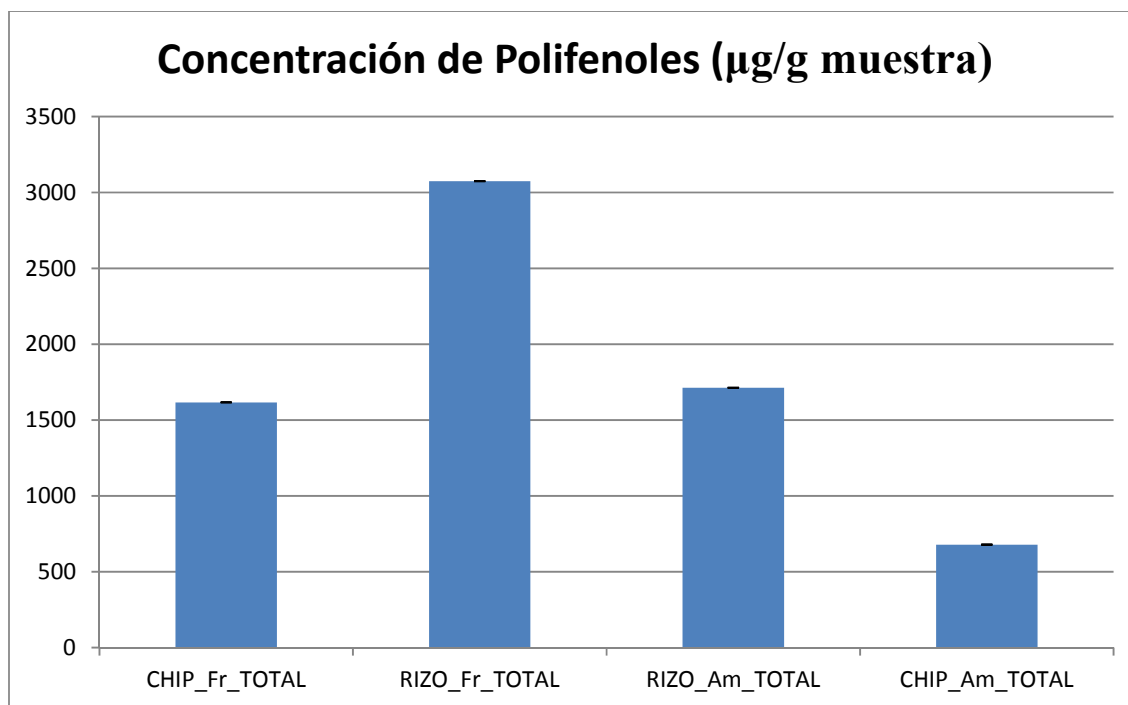


**Figura 32:** Espectro (a) UV-VIS y (b) masas de la muestra de agua (blanco).

Por tanto, el pico apareció aunque no estuviesen presentes ni las muestras ni los patrones, y se trataba del mismo pico, lo que indica que se trata de alguna impureza presente en los disolventes de las fases A y B empleadas y permite desechar la idea de una posible saturación en el detector.

Los picos NI 2 y NI 7 no fueron cuantificados ya que no era un solo compuesto, sino varios compuestos que eluyeron juntos y no se pudieron separar.

Para visualizar mejor los resultados obtenidos y así obtener ciertas conclusiones se realizó un gráfico en el que se representa la cantidad de polifenoles (incluyendo ácido gálico, elágico y los picos no identificados) en cada una de las muestras, y se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 33:



**Figura 33:** Cantidad de polifenoles en las diferentes muestras.

Se pudo observar que la cantidad de estos compuestos es mayor en los rizos, los cuáles no fueron sometidos a ningún proceso de tostado, además también se presentan en mayores cantidades en el roble francés que en el roble americano.

Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a dos factores, considerando como factores fijos el tipo de roble, el tipo de tostado y teniendo en cuenta la interacción entre ellos, para así poder comprobar la importancia de cada uno de estos factores.

El ANOVA se realizó con los datos que se muestran en la tabla 10 que corresponden a la cantidad de polifenoles para cada una de las tres extracciones realizadas en cada muestra.

**Tabla 10:** Concentración de polifenoles ( $\mu\text{g/g}$  muestra), tipo de madera y tipo de tostado.

	Tipo de madera	Tipo de tostado	Concentración( $\mu\text{g/ g}$ muestra)
<b>R. Americano 1</b>	AMERICANO	SIN TOSTAR	$1.71 \times 10^3$
<b>R. Americano 2</b>	AMERICANO	SIN TOSTAR	$1.71 \times 10^3$
<b>R. Americano 3</b>	AMERICANO	SIN TOSTAR	$1.71 \times 10^3$
<b>C. Americano 1</b>	AMERICANO	TOSTADO	$6.77 \times 10^2$
<b>C. Americano 2</b>	AMERICANO	TOSTADO	$6.82 \times 10^2$
<b>C. Americano 3</b>	AMERICANO	TOSTADO	$6.78 \times 10^2$
<b>R. Francés 1</b>	FRANCES	SIN TOSTAR	$3.08 \times 10^3$
<b>R. Francés 2</b>	FRANCES	SIN TOSTAR	$3.07 \times 10^3$
<b>R. Francés 3</b>	FRANCES	SIN TOSTAR	$3.07 \times 10^3$
<b>C. Francés 1</b>	FRANCES	TOSTADO	$1.61 \times 10^3$
<b>C. Francés 2</b>	FRANCES	TOSTADO	$1.62 \times 10^3$
<b>C. Francés 3</b>	FRANCES	TOSTADO	$1.62 \times 10^3$

Y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 11:

**Tabla 11:** Resultados del análisis de varianzas (Anova).

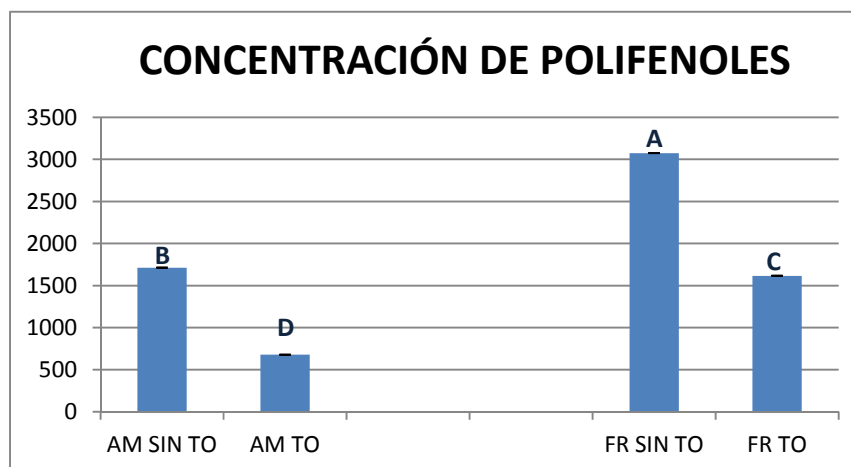
FACTOR	F	P
<b>Tipo de madera</b>	1139741,213	$< 0.0001$
<b>Tipo de tostado</b>	1338925,683	$< 0.0001$
<b>Madera×Tostado</b>	38762,746	$< 0.0001$

Con estos datos se comprobó que hay diferencias significativas en cuanto al tipo de madera ( $p < 0.0001$ ), en cuanto al tipo de tostado ( $p < 0.0001$ ), y en cuanto a su interacción ( $p < 0.0001$ ), y por tanto se confirmó que estos factores son determinantes en cuanto a la concentración de polifenoles en las diferentes muestras de madera de roble.

Se realizó una representación gráfica de la concentración de polifenoles según el tipo de madera y de tostado que aparecen en la tabla 12, y se obtuvieron los resultados de la figura 34, que muestra la interacción entre el tipo de madera y el tostado.

**Tabla 12:** Concentración de polifenoles ( $\mu\text{g/g}$  muestra) según el tostado y el tipo de madera.

CATEGORÍA	MEDIA	GRUPOS
Francés sin tostar	$3.07 \times 10^3$	A
Americano sin tostar	$1.71 \times 10^3$	B
Francés tostado	$1.62 \times 10^3$	C
Americano tostado	$6.79 \times 10^2$	D



**Figura 34:** Gráfico interacción tipo de madera y tostado. AM: americano. FR: francés. SIN TO: sin tostar. TO: tostado.

Al comprobar que hay diferencias significativas en cuanto al tipo de madera, al tostado y a la interacción de ambos factores, se pudo afirmar que la cantidad de polifenoles es significativamente mayor en el roble francés que en el roble americano y que la cantidad de polifenoles es también significativamente mayor en las maderas de roble que no han sido sometidas a procesos de tostado durante su elaboración.

Según los resultados obtenidos se pudo establecer un orden atendiendo a la cantidad de polifenoles en las muestras analizadas, que concuerda con la información sacada de la bibliografía<sup>15,16</sup> y con la hipótesis planteada sobre la influencia del tostado en los polifenoles.

Rizo Francés > Rizo Americano > Chip Francés > Chip Americano

## **6. CONCLUSIONES**



A lo largo de este trabajo se ha desarrollado una metodología analítica para la determinación de polifenoles en materiales obtenidos de madera de roble, lo que permitió alcanzar las siguientes logros y conclusiones:

1. Familiarización y desarrollo de un método de cromatografía líquida semipreparativa, que ha permitido obtener dos fracciones de polifenoles: F1 y F2.
2. Familiarización y desarrollo de un método de cromatografía líquida de alta resolución (UHPLC) con detectores tanto de espectrometría de masas (triple cuadrupolo) como UV-Vis, para la determinación y cuantificación de polifenoles presentes en chips de madera de roble.
3. Aplicación de herramientas estadísticas multivariantes (ANOVA a dos factores) para el tratamiento de datos.
4. Los resultados obtenidos muestran que el detector de espectrometría de masas es mas sensible que Uv-Vis en los compuestos analizados.
5. El roble americano presenta menores concentraciones de compuestos polifenólicos que el roble francés.
6. El proceso de tostado disminuye la concentración de los compuestos polifenólicos independientemente del tipo de roble.





## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- (1) Khanbabae, K.; van Ree, T. Tannins: Classification and definition. *Natural Product Reports* **2001**, *18*, 641-649.
- (2) Glabasnia, A.; Hofmann, T. Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 3380-3390.
- (3) Green, B. G. Oral astringency: A tactile component of flavor. *Acta Psychologica* **1993**, *84*, 119-125.
- (4) Breslin, P. A. S.; Gilmore, M. M.; Beauchamp, G. K.; Green, B. G. Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation. *Chemical Senses* **1993**, *18*, 405-417.
- (5) Alañón, M. E.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Gordon, M. H.; Pérez-Coello, M. S. Antioxidant capacity and phenolic composition of different woods used in cooperage. *Food Chemistry* **2011**, *129*, 1584-1590.
- (6) Alañón, M. E.; Schumacher, R.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Pérez-Coello, M. S. Enological potential of chestnut wood for aging Tempranillo wines Part II: Phenolic compounds and chromatic characteristics. *Food Research International* **2013**, *51*, 536-543.
- (7) González-Centeno, M. R.; Chira, K.; Teissedre, P. L. Ellagitannin content, volatile composition and sensory profile of wines from different countries matured in oak barrels subjected to different toasting methods. *Food Chemistry* **2016**, *210*, 500-511.
- (8) Chira, K.; Teissedre, P. L. Chemical and sensory evaluation of wine matured in oak barrel: effect of oak species involved and toasting process. *European Food Research and Technology* **2014**, *240*, 533-547.
- (9) Navarro, M.; Kontoudakis, N.; Giordanengo, T.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Fort, F.; Canals, J. M.; Hermosín-Gutierrez, I.; Zamora, F. Oxygen consumption by oak chips in a model wine solution; Influence of the botanical origin, toast level and ellagitannin content. *Food Chemistry* **2016**, *199*, 822-827.
- (10) Castro-Vázquez, L.; Alañón, M. E.; Ricardo-da-Silva, J. M.; Pérez-Coello, M. S.; Laureano, O. Evaluation of Portuguese and Spanish *Quercus pyrenaica* and *Castanea sativa* species used in cooperage as natural source of phenolic compounds. *European Food Research and Technology* **2013**, *237*, 367-375.
- (11) Viriot, C.; Scalbert, A.; Hervé du Penhoat, C. L. M.; Moutounet, M. Ellagitannins in woods of sessile oak and sweet chestnut dimerization and hydrolysis during wood ageing. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 1253-1260.
- (12) García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Alcalde-Eon, C. Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *660*, 171-176.
- (13) Bianco, M. A.; Handaji, A.; Savolainen, H. Quantitative analysis of ellagic acid in hardwood samples. *Science of the Total Environment* **1998**, *222*, 123-126.
- (14) Peng, S.; Scalbert, A.; Monties, B. Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 775-778.
- (15) García-Estévez, I.; Alcalde-Eon, C.; Le Grottaglie, L.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M. T. Understanding the ellagitannin extraction process from oak wood. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 3089-3094.
- (16) Zhang, B.; Cai, J.; Duan, C. Q.; Reeves, M. J.; He, F. A review of polyphenolics in oak woods. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*, 6978-7014.

